

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-252998

(43)Date of publication of application : 05.10.1993

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68  
C12N 15/10

(21)Application number : 04-089559

(71)Applicant : INTERNATL REAGENTS CORP

(22)Date of filing : 13.03.1992

(72)Inventor : AZUMA KAZUHIRO  
TAKADA ATSUYOSHI  
MORI HIROYUKI

## (54) METHOD FOR NMEASURING DNA AMPLIFIED BY PCR

### (57)Abstract:

PURPOSE: To measure a DNA fragment amplified by PCR(Polymerase Chain Reaction) by a sandwich hybridization method using a solid phase in excellent handleability and improved sensitivity.

CONSTITUTION: When PCR is carried out in a method for measuring a DNA amplified by PCR, 5' end of one of two kinds of primers is phosphorylated and the prepared product amplified by PCR is treated with  $\gamma$ -exonuclease to form a single stranded DNA suitable for sandwich hybridization. The single stranded DNA is caught on a solid phase and hybridized with a labeled probe to measure its labeling activity. Since the single stranded DNA is caught on the solid phase, disturbance by re-annealing can be avoided and measuring sensitivity and accuracy are improved.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 15.03.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3408265

[Date of registration] 14.03.2003

[Number of appeal against examiner's decision of

rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] One of two sorts of primers used in a sandwiches hybridization method using solid phase, being the methods of measuring DNA made to amplify by PCR (polymerase Chain Reaction) is the measuring method of PCR amplification DNA characterized by to include a production process which an PCR amplification product which a five prime end is the primer by which phosphorylation was carried out, and generated by performing PCR using two sorts of primers concerned is processed [ production process ] by lambda-exonuclease, and makes a single stranded DNA generate.

[Claim 2] Solid phase to which a probe which has a part of base sequence of amplification DNA in which a sandwiches hybridization method contains a primer chain by which phosphorylation is not carried out, and a complementary base sequence was fixed is used. Contact an PCR amplification product by which lambda-exonuclease processing was carried out with the solid phase concerned, and a single stranded DNA is caught on solid phase. Furthermore, after contacting a probe which has a part of base sequence [ at least ] of a caught single stranded DNA, and a complementary base sequence, and was labeled and making a probe and a single stranded DNA concerned hybridize, A measuring method of PCR amplification DNA according to claim 1 which is the method of measuring a single stranded DNA caught using an indicator.

[Claim 3] Under a condition of high salt concentration, a sandwiches hybridization method contacts an PCR amplification product by which lambda-exonuclease processing was carried out with solid phase, and catches a single stranded DNA on solid phase. Furthermore, after contacting a probe which has a part of base sequence [ at least ] of a caught single stranded DNA, and a complementary base sequence, and was labeled and making a probe and a single stranded DNA concerned hybridize, A measuring method of PCR amplification DNA according to claim 1 which is the method of measuring a single stranded DNA caught using an indicator.

[Claim 4] A measuring method of PCR amplification DNA according to claim 2 or 3 which an indicator of a labeled probe is an enzyme, measures absorbance change or fluorescence intensity by enzyme reaction of an enzyme and an enzyme substrate concerned, and measures a single stranded DNA based on the value.

[Claim 5] An indicator of a labeled probe is one side of a material pair which has affinity. To a hybrid of a single stranded DNA caught on solid phase, and a labeled probe Contact material of another side of a material pair and combination of an enzyme which have affinity, and an enzyme is caught through a material pair which has affinity. A measuring method of PCR amplification DNA according to claim 2 or 3 which measures absorbance change or fluorescence intensity by enzyme reaction of an enzyme and a substrate concerned, and measures a single stranded DNA based on the value.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the measuring method of the PCR amplification DNA. more -- details -- PCR (polymerase Chain Reaction) -- it is related with the method of measuring DNA amplified by law (a quantum or quality).

[0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, as a clinical laboratory test method of the infectious disease by the virus, bacteria, etc., methods, such as detection of the existence of a serum antibody and separation of the pathogen from a patient, were performed. However, in the former, a long period of time may be required by production of an antibody from infection, and an infection stage may be unable to be determined. Moreover, in the latter, generally, since there are few amounts of pathogens, it is necessary to cultivate to the amount which can repeat and detect a passage by the cultured cell, and there is a problem that measurement takes a long period of time. The method of diagnosing directly is proposed by making a pathogen genome amplify by the PCR method, and detecting from such a problem. According to this method, it is a short time and a diagnosis can be ensured. PCR is the method of aiming at amplification of a DNA fragment made into the purpose in a DNA sample as already known well, and it is carried out by repeating a thermal denaturation step, an annealing step, and an expanding reaction step using two sorts of primers and DNA polymerase which have a complementary base sequence to the base sequence (20 base sequence degree) of the suitable length which begins from 3' edge of the field which wants to amplify a DNA sample (double stranded DNA).

[0003] In order to carry out the quantum of the product DNA specifically amplified by PCR The way perform agarose gel electrophoresis for the PCR amplification product as it is, and the thickness of the signal of the specific band performs a quantum relatively by ethidium bromide dyeing; Agarose-gel-electrophoresis Ushiro, Alkali denaturation of the gel is carried out as it is, and DNA is made into a single strand. To a membrane After a DNA imprint, RI indicator DNA probe and the hybrid which have a complementary and specific array in the amplified PCR product are made to form. the method of carrying out the quantum of the RI activity by exposing an X-ray film more relatively than the thickness of the signal ;P A slot blot is carried out. CR amplification product -- as it is -- a membrane HEDOTTO blot -- A hybrid is formed by the same actuation using the same probe as a Southern blot technique, and there is the method of carrying out a relative quantum by the comparison with the control signal of the known amount by the strength of the sensitization signal by the X-ray film. Moreover, if it continues till recent years, the single strand PCR product and hybrid by which the blot was carried out to the membrane are formed using the DNA probe by which chemical modification was carried out to the enzyme instead of RI, and there is the method of carrying out the quantum of the signal after that, using a chromophoric substrate and a fluorescence substrate as an enzyme substrate.

[0004] Furthermore, recently the assay which used solid phase is also proposed and streptoavidin-agarose (or silica gel) is made into solid phase. The PCR product which amplified the five prime end with the pair of the primer which carried out biotin qualification, and the primer which carried out fluorescent material qualification is contacted to solid phase. It is made to combine with solid phase by making a streptoavidin-biotin complex form. How to measure the fluorescence [Axel Landgraf et al., Analytical biochemistry, 193, and 231-235] (1991); DNA binding protein (GCN4) is fixed in solid phase. Moreover, biotin-ize the five prime end of one primer, and PCR is performed to the five prime end of the primer of another side using what introduced the junction sequence to GCN4. Contact above-mentioned solid phase and an above-mentioned PCR amplification product, and DNA (2 chains) is caught through GCN4. Furthermore, make the avidin-enzyme combination

(peroxy DASE etc.) prepared beforehand contact, it is made to join together through biotin-avidin association, and the method of subsequently measuring enzyme activity etc. is learned.

[0005] Moreover, the sandwiches hybridization method using the solid phase of an ELISA plate etc. (in this specification) With the sandwiches hybridization method using solid phase While changing into a single stranded DNA DNA amplified by PCR, it catches on solid phase. Make the probe which has a part of base sequence [ at least ] of the single stranded DNA concerned, and a complementary base sequence, and has an indicator contact, and hybridization of a single stranded DNA and a probe is performed. what means how to measure DNA caught on solid phase using the indicator -- also carrying out -- it is carried out. After carrying out thermal denaturation processing of the PCR amplification product and considering as a single stranded DNA as this kind of measurement, for example, the method of making carry out sequential contact of the probe and avidin-enzyme combination (peroxy DASE etc.) which a single stranded DNA is made to stick to solid phase under the condition of high salt concentration, and have the single stranded DNA concerned and a complementary base sequence hereafter, and have a biotin, and carrying out the quantum of the amplification DNA by subsequently measuring enzyme activity is learned.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] In the above-mentioned method, the quantum by the dyeing reinforcement of DNA by the ethidium bromide used since the time of the first stage had to perform agarose gel electrophoresis once, its actuation was very complicated, and since the comparison with the migration signal of DNA of the moreover almost same molecular weight of a known amount performed thickness of the signal of the band of DNA with which specification migrated, only the relative strength could determine but the fine quantum was impossible. Moreover, a Southern blot technique imprints DNA from migration gel to a membrane, and in order to make the DNA probe and hybrid which carried out RI qualification to the membrane form, its actuation is very complicated and it tends to be influenced by blot effectiveness. Moreover, it can quantify only by the comparison with the signal of known control DNA also to the obtained signal, but the fine quantum is impossible like an ethidium bromide staining technique. Compared with this, although a dot blot and slot blotting methods of electrophoresis are unnecessary and easy, they cannot judge the joint signal (unique) of DNA probes other than the PCR product of a target.

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

TECHNICAL FIELD

---

[Industrial Application] This invention relates to the measuring method of the PCR amplification DNA. more -- details -- PCR (polymerase Chain Reaction) -- it is related with the method of measuring DNA amplified by law (a quantum or quality).

[0002]

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## PRIOR ART

[Description of the Prior Art] Conventionally, as a clinical laboratory test method of the infectious disease by the virus, bacteria, etc., methods, such as detection of the existence of a serum antibody and separation of the pathogen from a patient, were performed. However, in the former, a long period of time may be required by production of an antibody from infection, and an infection stage may be unable to be determined. Moreover, in the latter, generally, since there are few amounts of pathogens, it is necessary to cultivate to the amount which can repeat and detect a passage by the cultured cell, and there is a problem that measurement takes a long period of time. The method of diagnosing directly is proposed by making a pathogen genome amplify by the PCR method, and detecting from such a problem. According to this method, it is a short time and a diagnosis can be ensured. PCR is the method of aiming at amplification of a DNA fragment made into the purpose in a DNA sample as already known well, and it is carried out by repeating a thermal denaturation step, an annealing step, and an expanding reaction step using two sorts of primers and DNA polymerase which have a complementary base sequence to the base sequence (20 base sequence degree) of the suitable length which begins from 3' edge of the field which wants to amplify a DNA sample (double stranded DNA).

[0003] In order to carry out the quantum of the product DNA specifically amplified by PCR, The way perform agarose gel electrophoresis for the PCR amplification product as it is, and the thickness of the signal of the specific band performs a quantum relatively by ethidium bromide dyeing; Agarose-gel-electrophoresis Ushiro, Alkali denaturation of the gel is carried out as it is, and DNA is made into a single strand. To a membrane After a DNA imprint, RI indicator DNA probe and the hybrid which have a complementary and specific array in the amplified PCR product are made to form. the method of carrying out the quantum of the RI activity by exposing an X-ray film more relatively than the thickness of the signal ;P A slot blot is carried out. CR amplification product -- as it is -- a membrane HEDOTTO blot -- A hybrid is formed by the same actuation using the same probe as a Southern blot technique, and there is the method of carrying out a relative quantum by the comparison with the control signal of the known amount by the strength of the sensitization signal by the X-ray film. Moreover, if it continues till recent years, the single strand PCR product and hybrid by which the blot was carried out to the membrane are formed using the DNA probe by which chemical modification was carried out to the enzyme instead of RI, and there is the method of carrying out the quantum of the signal after that, using a chromophoric substrate and a fluorescence substrate as an enzyme substrate.

[0004] Furthermore, the thing which the assay which used solid phase is also proposed recently, streptoavidin-agarose (or silica gel) is made into solid phase, and you contact the PCR product which amplified the five prime end with the pair of the primer which carried out biotin qualification, and the primer which carried out fluorescent material qualification to solid phase, and is made to form a streptoavidin-biotin complex Method [Axel Landgraf et al. who is combined with solid phase and measures the fluorescence, Analytical biochemistry, 193, 231-235 (1991)]; DNA binding protein (GCN4) is fixed in solid phase. Moreover, biotinize the five prime end of one primer, and PCR is performed to the five prime end of the primer of another side using what introduced the junction sequence to GCN4. Contact above-mentioned solid phase and an above-mentioned PCR amplification product, and DNA (2 chains) is caught through GCN4. Furthermore, make the avidin-enzyme combination (peroxy DASE etc.) prepared beforehand contact, it is made to join together through biotin-avidin association, and the method of subsequently measuring enzyme activity etc. is learned.

[0005] Moreover, the sandwiches hybridization method using the solid phase of an ELISA plate etc. (setting on these specifications) what means how to measure DNA which was contacted in the sandwiches hybridization method using solid phase with the probe which catches on solid phase while changing into a single stranded DNA DNA amplified by PCR, has a part of base sequence [ at least ] of the single stranded DNA concerned,

and a complementary base sequence, and has an indicator, performed hybridization of a single stranded DNA and a probe, and was caught on solid phase using the indicator -- also carrying out -- it is carried out. After carrying out thermal denaturation processing of the PCR amplification product and considering as a single stranded DNA as this kind of measurement, for example, the method of making carry out sequential contact of the probe and avidin-enzyme combination (peroxy DASE etc.) which a single stranded DNA is made to stick to solid phase under the condition of high salt concentration, and have the single stranded DNA concerned and a complementary base sequence hereafter, and have a biotin, and carrying out the quantum of the amplification DNA by subsequently measuring enzyme activity is learned.

---

[Translation done.]



\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

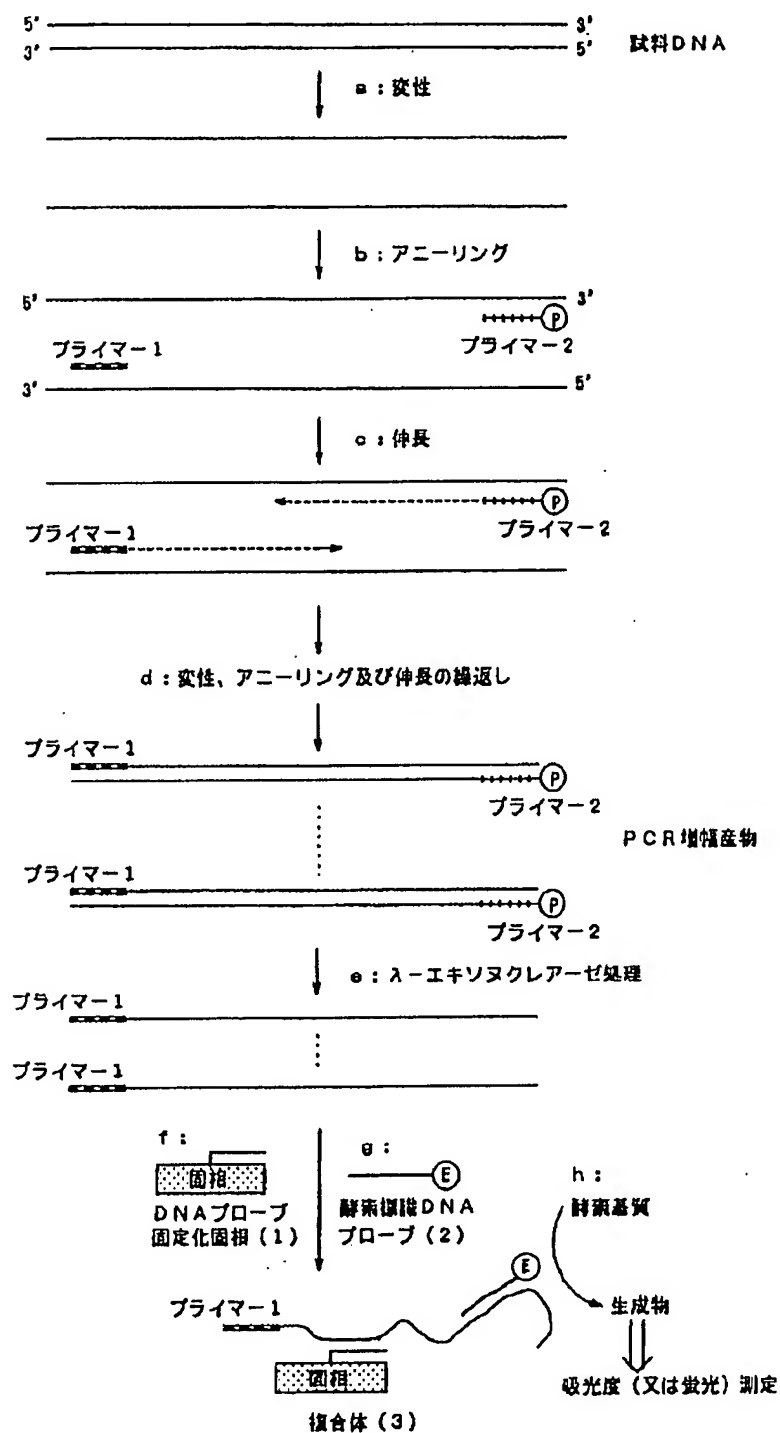
EFFECT OF THE INVENTION

---

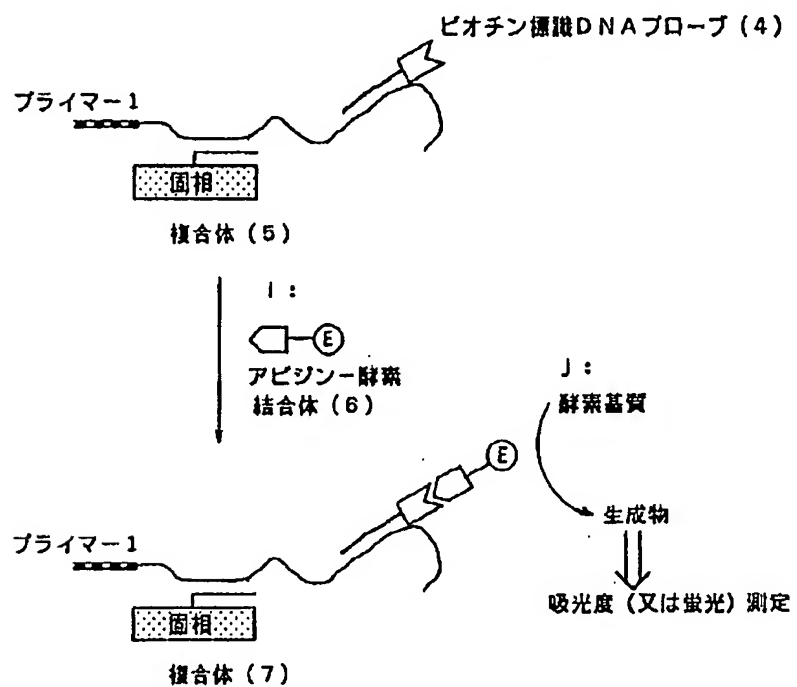
[Effect of the Invention] As mentioned above, primer used for PCR in the measuring method of this invention Since what the phosphoric acid added to the five prime end is used, a single stranded DNA generates one of two sorts of sorts by carrying out lambda-exonuclease processing of the PCR amplification product acquired. Since this single stranded DNA is measured by sandwiches high buoy DAIZESHON, active jamming of re-annealing is not received, and it is highly precise with sufficient sensitivity, and can measure, and, moreover, the effect that measurement actuation is simple is done so.

---

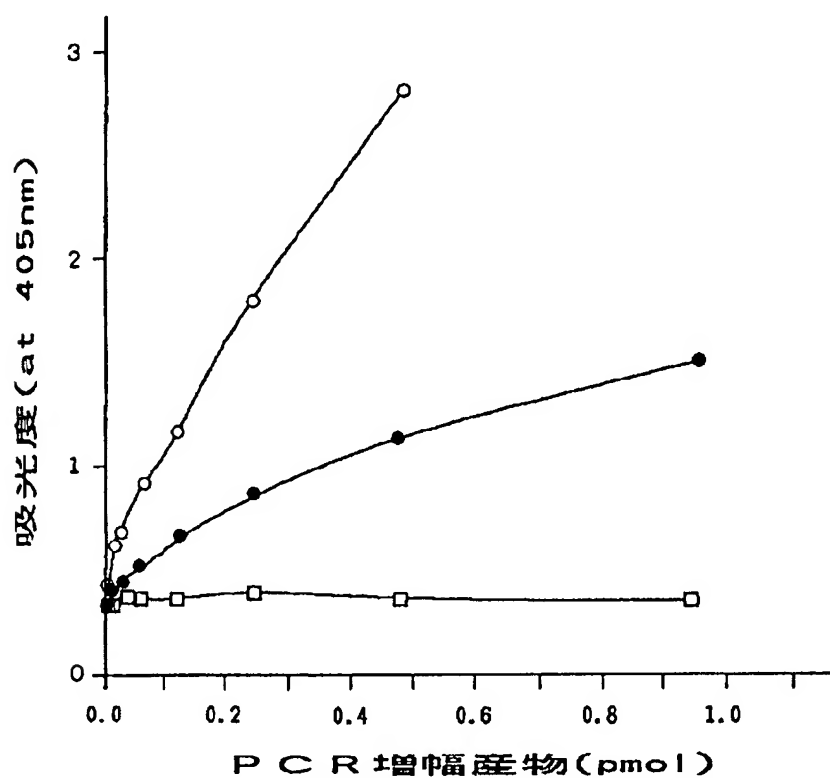
[Translation done.]

Drawing selection drawing 1

[Translation done.]

Drawing selection drawing 2

[Translation done.]

Drawing selection drawing 3

- : λ-エキソヌクラーゼ処理したもの  
●: 加熱急冷変性したもの  
□: λ-エキソヌクラーゼ処理しないもの

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-252998

(43)公開日 平成5年(1993)10月5日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	A	8114-4B		
C 1 2 N 15/10		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数5(全 9 頁)

(21)出願番号	特願平4-89559	(71)出願人	000170565 国際試薬株式会社 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号
(22)出願日	平成4年(1992)3月13日	(72)発明者	東 一博 神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内
		(72)発明者	高田 温美 神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内
		(72)発明者	森 浩之 神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内
		(74)代理人	弁理士 廣瀬 孝美

(54)【発明の名称】 PCR増幅DNAの測定法

(57)【要約】

【目的】 PCR(Polymerase Chain Reaction)により増幅したDNA断片を、固相を用いたサンドイッチハイブリダイゼーション法により測定する方法であって、操作性に優れると共に感度の良好な測定法を提供することを目的とする。

【構成】 本発明のPCR増幅DNAの測定法は、PCRを行うに際し、用いられる2種のプライマーのうちの1種の5'末端をリン酸化しておき、得られたPCR増幅産物をλ-エキソヌクレアーゼで処理することによって、サンドイッチハイブリダイゼーションに好適な1本鎖DNAを生成させ、当該1本鎖DNAを固相上に捕捉し、標識化プローブとハイブリダイズさせ、その標識活性を測定することからなる。本発明においては、上記1本鎖DNAを固相上に捕捉するので、再アニーリングによる妨害を回避でき、測定感度及び精度の向上が図れる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 固相を用いたサンドイッチハイブリダイゼーション法にて、PCR(polymerase Chain Reaction)により増幅させたDNAを測定する方法であって、使用される2種のプライマーのうちの1種は5'末端がリン酸化されたプライマーであり、当該2種のプライマーを用いてPCRを行い、生成したPCR増幅産物をλ-エキソヌクレアーゼで処理して1本鎖DNAを生成させる工程を含むことを特徴とするPCR増幅DNAの測定法。

【請求項2】 サンドイッチハイブリダイゼーション法が、リン酸化されていないプライマー鎖を含む増幅DNAの塩基配列の一部と相補的な塩基配列を有するプローブが固定された固相を用い、当該固相とλ-エキソヌクレアーゼ処理されたPCR増幅産物を接触させて固相上に1本鎖DNAを捕捉し、更に捕捉された1本鎖DNAの塩基配列の少なくとも一部と相補的な塩基配列を有し且つ標識化されたプローブを接触させて当該プローブと1本鎖DNAとをハイブリダイズさせた後、標識を用いて捕捉された1本鎖DNAを測定する方法である請求項1記載のPCR増幅DNAの測定法。

【請求項3】 サンドイッチハイブリダイゼーション法が、高塩濃度の条件下、固相とλ-エキソヌクレアーゼ処理されたPCR増幅産物を接触させて固相上に1本鎖DNAを捕捉し、更に捕捉された1本鎖DNAの塩基配列の少なくとも一部と相補的な塩基配列を有し且つ標識化されたプローブを接触させて当該プローブと1本鎖DNAとをハイブリダイズさせた後、標識を用いて捕捉された1本鎖DNAを測定する方法である請求項1記載のPCR増幅DNAの測定法。

【請求項4】 標識化されたプローブの標識が酵素であり、当該酵素と酵素基質との酵素反応による吸光度変化又は蛍光強度を測定し、その値に基づいて1本鎖DNAを測定する請求項2又は3記載のPCR増幅DNAの測定法。

【請求項5】 標識化されたプローブの標識が結合性を有する物質対の一方であり、固相上に捕捉された1本鎖DNAと標識化されたプローブのハイブリッドに、結合性を有する物質対の他方の物質と酵素の結合体を接触させ、結合性を有する物質対を介して酵素を捕捉し、当該酵素と基質との酵素反応による吸光度変化又は蛍光強度を測定し、その値に基づいて1本鎖DNAを測定する請求項2又は3記載のPCR増幅DNAの測定法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はPCR増幅DNAの測定法に関する。より詳細には、PCR(polymerase Chain Reaction)法により増幅されたDNAを測定(定量又は定性)する方法に関する。

## 【0002】

2

【従来の技術】 従来、ウイルス、細菌等による感染症の臨床検査法としては、血清抗体の存在の検出や患者からの病原体の分離などの方法が行われていた。しかし、前者においては感染から抗体の産生までに長期間を要する場合があり、感染時期を決定できないことがある。また、後者においては、一般に病原体量が少ないため、培養細胞で継代を繰返して検出できる量まで培養する必要があり、測定に長期間を要するという問題がある。このような問題から、PCR法により病原体ゲノムを増幅させて検出することにより直接的に診断を行なう方法が提案されている。この方法によれば、短時間で且つ確実に診断を行うことができる。既によく知られているように、PCRはDNA試料中の目的とするDNA断片の増幅を図る方法で、DNA試料(2本鎖DNA)の増幅したい領域の3'端から始まる適当な長さの塩基配列(20塩基配列程度)に相補的な塩基配列を有する2種のプライマー及びDNAポリメラーゼを用い、熱変性ステップ、アニーリングステップ及び伸長反応ステップを繰り返すことにより行われる。

【0003】 PCRにより特異的に増幅したプロダクトDNAを定量するためには、そのPCR増幅産物をそのままアガロースゲル電気泳動を行い臭化エチジウム染色にてその特異的バンドのシグナルの濃さにより相対的に定量を行う方法;アガロースゲル電気泳動後、そのゲルをそのままアルカリ変性し、DNAを一本鎖としメンブレンへDNA転写後、増幅したPCRプロダクトに相補的で特異的な配列をもつRI標識DNAプローブとハイブリッドを形成させ、そのRI活性をX線フィルムを感光させることによりそのシグナルの濃さより相対的に定量する方法;PCR増幅産物をそのままメンブレンヘッドプロットやスロットプロットし、サザンプロット法と同様のプローブを用い同様な操作にてハイブリッドを形成し、X線フィルムによるその感光シグナルの強さによる既知量のコントロールシグナルとの比較により相対定量する方法がある。また、近年に至っては、RIに代り酵素と化学修飾されたDNAプローブを用い、メンブレンにプロットされた一本鎖PCRプロダクトとハイブリッドを形成し、その後酵素基質として発色基質や蛍光基質を用いてそのシグナルを定量する方法がある。

【0004】 更に最近では、固相を用いた定量法も提案されており、ストレプトアビジン-アガロース(又はシリカゲル)を固相とし、5'末端をビオチン修飾したプライマーと蛍光物質修飾したプライマーのペアで増幅したPCRプロダクトを固相と接触させ、ストレプトアビジン-ビオチン複合体を形成させることにより固相に結合させ、その蛍光を測定する方法[Axel Landgrafら、Analytical biochemistry, 193, 231-235 (1991)];固相にDNA結合蛋白質(GCN4)を固定化し、また一方のプライマーの5'末端をビオチン化し、他方のプライマーの5'末端にGCN4に対する結合配列を導入し

たものを用いてPCRを行い、上記の固相とPCR増幅産物とを接触させ、GCN4を介してDNA（2本鎖）を捕捉し、更に予め調製したアビジン-酵素（パーオキシダーゼなど）結合体と接触させてピオチン-アビジン結合を介して結合させ、次いで酵素活性を測定する方法などが知られている。

【0005】また、ELISAプレートなどの固相を用いるサンドイッチハイブリダイゼーション法（本明細書においては、固相を用いるサンドイッチハイブリダイゼーション法とは、PCRにより増幅したDNAを1本鎖DNAに変換すると共に固相上に捕捉し、当該1本鎖DNAの塩基配列の少なくとも一部と相補的な塩基配列を有し且つ標識を有するプローブと接触させて1本鎖DNAとプローブとのハイブリッド形成を行い、標識を利用して固相上に捕捉されたDNAを測定する方法を意味するものとする）も行われている。この種の測定としては、例えば、PCR増幅産物を熱変性処理して1本鎖DNAとした後、高塩濃度の条件下、1本鎖DNAを固相に吸着させ、以下、当該1本鎖DNAと相補的な塩基配列を有し且つピオチンを有するプローブ及びアビジン-酵素（パーオキシダーゼなど）結合体を順次接触させ、次いで酵素活性を測定することにより増幅DNAを定量する方法が知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上述の方法において、初期の頃から使われてきた臭化エチジウムによるDNAの染色強度による定量は、一度アガロースゲル電気泳動を行わなくてはならず操作が非常に複雑であり、また特定の泳動されたDNAのバンドのシグナルの濃さを既知量のしかもほぼ同じ分子量のDNAの泳動シグナルとの比較により行うので、その相対的強さによってしか決定できず細かい定量は不可能であった。また、サザンブロット法は泳動ゲルからメンブレンへのDNAの転写を行い、そのメンブレンに対してRI修飾したDNAプローブとハイブリッドを形成させるため、操作が非常に複雑でありブロット効率にも影響され易い。また、得られたシグナルに対しても既知コントロールDNAのシグナルとの比較によってしか定量化できず臭化エチジウム染色法と同様に細かい定量は不可能である。これに比べ、ドットブロットやスロットブロット法は電気泳動は不要で簡単ではあるがターゲットのPCRプロダクト以外とのDNAプローブの結合シグナル（非特異）が判定できない。また、ストレプトアビジン-アガロース固相を用いてプライマー側のピオチンと複合体を作ることにより固相に結合し、そのPCRプロダクトの蛍光を測定する方法は、ピオチン修飾プライマーと蛍光物質修飾プライマーのペアで非特異的にPCR増幅してしまったプロダクトもストレプトアビジン-アガロース固相へ結合してしまいプライマーの選択によっては特異性が保持できない。また、ピオチン及びDNA結合蛋白質（GCN4）

に対する結合配列を結合させた2種のプライマーを用いる方法では、これら2種のプライマーを調製する必要があり、操作が煩雑である。更に、サンドイッチハイブリダイゼーション法において、熱変性により生成した1本鎖DNAを固相に吸着させる方法では、解離したDNAの再アニーリングが生じて2本鎖DNAとなり易く、固相に吸着されないPCR増幅産物が多くなり、定量性に問題がある。本発明は上記従来技術の問題を解消するためになされたもので、本発明は測定精度の高いとともに操作性に優れたPCR増幅DNAの測定法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するため、本発明者等は操作性に優れたサンドイッチハイブリダイゼーション法を用いてPCR増幅DNAの測定を行う方法を鋭意検討した結果、PCR増幅産物から1本鎖DNAを調製する工程を改良することにより、測定精度の著しい向上が図れることを見出して本発明を完成させた。即ち、本発明のPCR増幅DNAの測定法は、固相を用いたサンドイッチハイブリダイゼーション法にて、PCRにより増幅させたDNAを測定する方法であって、使用される2種のプライマーのうちの1種は5'末端がリン酸化されたプライマーであり、当該2種のプライマーを用いてPCRを行い、生成したPCR増幅産物をλ-エキソヌクレアーゼで処理して1本鎖DNAを生成させる工程を含むことからなる。上記のサンドイッチハイブリダイゼーション法の好ましい態様としては、リン酸化されていないプライマー鎖を含む増幅DNAの塩基配列の一部と相補的な塩基配列を有するプローブが固定された固相を用い、当該固相とλ-エキソヌクレアーゼ処理されたPCR増幅産物を接触させて固相上に1本鎖DNAを捕捉し、更に捕捉された1本鎖DNAの塩基配列の少なくとも一部と相補的な塩基配列を有し且つ標識化されたプローブを接触させて1本鎖DNAとプローブとをハイブリダイズさせた後、標識を用いて捕捉された1本鎖DNAを測定する方法；及び高塩濃度の条件下、固相とλ-エキソヌクレアーゼ処理されたPCR増幅産物を接触させて固相上に1本鎖DNAを捕捉し、更に捕捉された1本鎖DNAの塩基配列の少なくとも一部と相補的な塩基配列を有し且つ標識化されたプローブを接触させて1本鎖DNAとプローブとをハイブリダイズさせた後、標識を用いて捕捉された1本鎖DNAを測定する方法が挙げられる。

【0008】本発明は上記の構成からなり、PCR反応に用いる二種のプライマーのうち、どちらか一方のプライマーの5'末端をリン酸化（即ち、リン酸の付加）しておき、これらのプライマーでPCR増幅を行い、その後生成したPCR増幅産物（2本鎖DNA）を、λ-エキソヌクレアーゼ（E.C. 3.1.11.3）を用いて、リン酸付加したプライマーから伸長したDNA鎖のみを分解して

一本鎖DNAとするもので、再アニーリングする可能性をなくすることができる。以下、本発明の測定法を添付図面に基いて説明する。図1は本発明の方法の一例を模式的に示した概略工程図であり、プローブの標識として酵素を用い、酵素反応による吸光度変化や蛍光強度を測定することによりPCR増幅DNAを測定する例を示す。図中、丸で囲まれたPはリン酸基を示し、また丸で囲まれたEは酵素を示す。なお、PCRによる増幅は常法に準じて行なうことができ、以下の説明に限定されるものではない。

【0009】まず、使用される2種のプライマーの調製を行なう。プライマーは、DNA試料の増幅したい領域の3'から始まる適当な長さの塩基配列（通常20塩基程度）と相補的な塩基配列を有するDNA断片であり、DNAの（+）鎖及び（-）鎖に対応して2種類を常法に準じて化学的に合成する。本発明では、上記の2種のプライマーのうち的一方はその5'末端にリン酸を付加させる。5'末端のリン酸付加は慣用的方法で行なうことができ、例えば、適当な緩衝液中、プライマーをATP及びpolynucleotide kinaseで処理することにより得る

ことができる。かくして得られた、5'末端がリン酸化されていないプライマー（以下、プライマー1という）及び5'末端がリン酸化されたプライマー（以下、プライマー2という）を用い、以下の手順で測定を行なう。

【0010】試料である2本鎖DNAの変性を行ない、2つの1本鎖DNAに解離させる（工程a）。この工程は、一般的に90～95℃程度で20秒～5分間程度加熱することにより行われる。この際、不必要に加熱することは、後記するDNAポリメラーゼを失活させるので好ましくない。

【0011】上記の変性により1本鎖になったDNAを、前記の2種のプライマー（プライマー1及びプライマー2）の存在下、温度を低下させることにより、2種のプライマーをそれぞれに相補的な1本鎖DNAとアニーリングさせる（工程b）。この工程は、通常、40～65℃程度、20秒～2分間程度で行われる。

【0012】次いで、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTP）の共存下、DNAポリメラーゼを作用させ、鋳型DNAの塩基配列に従ってプライマーの伸長反応を行うことにより、プライマーを含む新しい相補的なDNA鎖をそれぞれ合成する（工程c）。この工程において用いられるDNAポリメラーゼとしては、耐熱性DNAポリメラーゼであるTaq DNAポリメラーゼが好適に使用され、熱変性時の失活の防止やアニーリング温度の上昇が図れる。反応条件としては、通常、70～75℃程度、1.5～3分間程度で行われる。

【0013】かくして得られた2つの2本鎖DNAに対し、上記の変性、アニーリング及び伸長のサイクルを繰返し、DNAの増幅を行なう（工程d）。この工程の反応条件としては、下記のような条件が挙げられる。

DNAの変性	90～95℃、30～60秒程度
プライマーのアニーリング	40～65℃、20～50秒程度
DNAの合成（伸長）	70～75℃、90～150秒程度

なお、サイクル数は特に限定されず、試料DNAの初濃度などにより適宜調整することができるが、通常、20～50サイクル程度とされる。サイクル数を増やせば増幅DNA量は増加するが、ミスアニーリングなどに起因する非特異産物の量も増加し、測定精度を低下させるおそれがある。かかる増幅により、プライマー1から伸長したDNAとプライマー2から伸長したDNAとが相補的に結合した2本鎖DNAが大量に合成され、PCR増幅産物が得られる。

【0014】次いで、上記で得られたPCR増幅産物をλ-エキソヌクレアーゼで処理する（工程e）。λ-エキソヌクレアーゼは、5'末端にリン酸が付加したDNAを当該末端から順に切断する作用を有するので、プライマー2から伸長したDNAは分解され、末端にリン酸が付加していないプライマー1から伸長したDNA（以下、プライマー1側DNAという）のみが残る。この工程は、適当な緩衝液中、λ-エキソヌクレアーゼの存在下、30～40℃程度、5～20分間程度の条件下で行われる。

【0015】上記で得られたプライマー1側DNAを、当該DNAの塩基配列の一部と相補的な塩基配列を有するDNAが固定されたDNAプローブ固定化固相（1）と接触させ、プライマー1側DNAを固相上に捕捉する（工程f）。更に、プライマー1側DNAの塩基配列の少なくとも一部と相補的な塩基配列を有し且つ標識（この例では酵素）を有する酵素標識DNAプローブ（2）を接触させ、当該プローブとプライマー1側DNAとをハイブリダイズさせる（工程g）。かくして、固相上にプライマー1側DNAが捕捉され、更にプライマー1側DNAに酵素標識DNAプローブ（2）がハイブリダイズした複合体（3）が得られる。

【0016】次いで、複合体（3）を洗浄し、フリーの酵素標識DNAプローブ（2）を除いた後、酵素基質を加えて酵素反応を行ない、酵素反応による吸光度変化又は蛍光強度などを測定する（工程h）。この値に基づき、予め作成した検量線などから固相上に捕捉されたプライマー1側DNAの量を求めることにより、PCR増幅DNAを定量することができる。

【0017】図2は、本発明の測定法の他の例を模式的に示した概略工程図であり、上記の例で用いられた酵素標識DNAプローブ（2）に代えて、標識として、結合性を有する物質対の一方の物質が結合しているDNAプローブを用いる例を示す。結合性を有する物質対としては、ビオチン-アビジン（又はストレプトアビジン）



対、コンカナバリンA-糖類（例えば、グルコース等）対などが例示される。図2の例では、ビオチンが結合したDNAプローブであるビオチン標識DNAプローブ（4）が用いられている。より詳細には、図1の方法における工程aからfまでは同様に処理した後、工程gにおいて、酵素標識DNAプローブ（2）に代えてビオチン標識DNAプローブ（4）を用いることにより、固相上にプライマー1側DNAが捕捉され、更にプライマー1側DNAにビオチン標識DNAプローブ（4）がハイブリダイズした複合体（5）が得られる。当該複合体（5）にアビジン-酵素結合体（6）を接触させることにより、ビオチン-アビジン結合を介して酵素が固相上に捕捉され、複合体（7）が得られる。かくして得られた複合体（7）に酵素基質を加え、前述と同様に酵素反応による吸光度変化又は蛍光強度を測定することにより、PCR増幅DNAを定量することができる。

【0018】図1及び図2に示される測定法で用いられるDNAプローブ固定化固相（1）の固相としては、従来からELISA法で用いられている固相が使用でき、例えば、アガロース、セファロース、プラスチック、ガラスなどが例示され、通常、マイクロタイタープレートが好適に使用される。固相上にDNAプローブを固定化する方法としては、吸着法によっても行なうことができるが、好ましくは固相とDNAプローブとを共有結合で結合する方法が挙げられる。この共有結合法としては、従来からELISA法などで用いられている各種の共有結合形成法を採用することができ、例えば、固相及びDNAプローブの両方に反応性基（例えば、アミノ基、チオール基、カルボキシル基など）を導入し、この間を適当な2官能性試薬を用いて共有結合で結合させる方法が挙げられる。この方法で用いられる2官能性試薬としては、例えば、グルタルアルデヒド等のジアルデヒド類、ヘキサメチレンジイソシアネート等のジイソシアネート類、Disuccinimidyl suberate等のジスクシンイミド類、N-(ε-Maleimidocaproyloxy)succinimide等のマレイミド基とスクシンイミド基を有する化合物などが例示される。

【0019】また、酵素標識DNAプローブ（2）及びビオチン標識DNAプローブ（4）も常法により調製することができる。例えば、上記と同様に、DNAプローブに反応性基を導入した後、適当な2官能性試薬を用いて酵素（又はビオチン）とDNAプローブとを結合させることにより調製することができる。更に、アビジン-酵素結合体（6）も常法により調製でき、例えば、アビジン及び酵素の有する反応性基を利用して、適当な2官能性試薬を用いてアビジンと酵素を結合させることにより調製することができる。標識として用いられる酵素としては、酵素反応により吸光度の変化が生ずるものや蛍光物質を生成するものであれば特に限定されないが、通常、パーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、β

ガラクトシダーゼなどが用いられる。酵素がパーオキシダーゼやアルカリフォスファターゼの場合には、それぞれの酵素基質であるo-フェニレンジアミン-過酸化水素やp-ニトロフェニルフォスフェートを加え、生成物の吸光度を測定することにより酵素活性を測定し、この値に基づいてPCR増幅DNAを測定する。また、酵素がβ-ガラクトシダーゼの場合には、酵素基質として4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシドを加え、生成するウンベリフェロンの蛍光強度を測定し、この値に基づいてPCR増幅DNAを測定する。

【0020】なお、本発明の測定法は上記の例に限定されるものではなく、適宜変更して実施することができる。例えば、上記の例では、固相上にDNAプローブを固定したDNAプローブ固定化固相（1）を用いているが、工程eで生成したプライマー1側DNAを、高塩濃度（例えば、1.5M塩化カルシウム又は0.5M硫酸アンモニウム等）条件下で固相に吸着させて固定化する方法でもよい。また、プライマー1として、その5'末端に結合性を有する物質の一方（例えば、ビオチン）を付加したものをを用い、また固相としてアビジン標識固相を用いて、プライマー1側DNAをアビジン-ビオチン結合を介して固相上に捕捉してもよい。更に、上記の例の酵素に代えて放射性物質を用い、RI活性を測定する方法であってもよい。

【0021】本発明のPCR増殖DNAの測定法は、PCR産物の測定を行う種々の方法に適用することができる。例えば、臨床検査などの分野で好適に利用される。本発明の測定法を臨床検査に応用した例として、病原体の検出を図1に示される測定法で行う例をもって説明すると、被検者から採取した血清などを試料とし、病原体ゲノムの塩基配列に基づいて調製したプライマー1及びプライマー2を用い、工程aから工程hを経て酵素活性を測定する。検体中に病原体ゲノムが存在する場合には、固相上にプライマー1側DNAが捕捉されて複合体（3）が形成され、酵素活性が認められる。それに対して、検体中に病原体ゲノムが存在しない場合には、PCRによるDNAの増幅が起こらないので、複合体（3）は形成されず、酵素活性は認められない。この測定結果から、被検者が病原体に感染しているか否かを診断することができ、更に酵素活性を定量することにより病原体量を定量することができる。検体としては、PCR増幅が可能なDNA試料の全てに応用することができ、例えば、ウイルスとしては、HBV(Hepatitis B virus)、HVC(Hepatitis C virus)、HIV(Human immunodeficiency virus)、HSV-I(Herpes simplex virus I)、HSV-II(Herpes simplex virus II)、HCMV(Human cytomegalovirus)、EBV(Epstein-barr virus)、HHV-6(Human herpes virus 6)、VZV(Varicella zoster virus)などが例示され、細菌としてはMRSA(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus)などが

例示される。

#### 【0022】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

HBV DNAのPCR産物の検出に応用した例を以下に示す。

#### 1. 試薬

##### ①PCRプライマーの調製

HBV DNAの塩基配列を元にして、2種のプライマーの塩基配列を以下のように設定し、Applied Biosystems社製のDNA synthesizer(381A)を用いて合成した。

プライマーA 5' CGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTG

プライマーB 5' TGGAAAGTAGAGGACAAACGGGCAAC

プライマーBについては、更にATPの存在下、T4 Polynucleotide Kinaseを作用させることによりリン酸化を以下のように行った。プライマーB 100pmolに10μlの緩衝液[100mM MgCl<sub>2</sub>・100mM 2-mercaptoethanol・500mM Tris-HCl(pH8.0)]、2μlの50mM ATP、1μlのT4 polynucleotide kinaseを加え精製水で総量100μlとし37℃、60分反応させた。反応は70℃、10分間処理することにより停止した。

##### 【0023】②DNAプローブ固定化固相の調製

固相用プローブとしては、上記のプライマーA、B間で増幅されたDNA領域内に以下のように設定し、Applied Biosystems社製のDNA synthesizer(381A)を用いて合成し、アミノリンクIIを用いてその5'末端にアミノ基を付加した。

5' NH<sub>2</sub>-GATAAAACGCCGCAGACACATCCAGCGATA

アミノ基を付加したDNAをDSS(disuccinimidyl suberate)を用いて、アミノ基含有マイクロタイタープレート(Nunc社製Covalink)に共有結合させることによってDNAプローブ固定化固相を作製した。

##### 【0024】③アルカリフォスファターゼ標識DNAプローブの調製

シグナル検出用の酵素標識プローブとしては、上記のプライマーA、B間で増幅されたDNA領域内に以下のように設定し、Applied Biosystems社製のDNA synthesizer(381A)を用いて合成し、アミノリンクIIを用いてその5'末端にアミノ基を付加した。

5' NH<sub>2</sub>-AAAATTGAGAGAAGTCCACCA CGAGTCTAG

アミノ基を付加したDNAをEMCS[N-(ε-Maleimidocaproyloxy)succinimide]を用いてマレイミド化し、一方アルカリフォスファターゼは2-Iminothiolaneを用いてSH基を付加した。両者を混合反応させることによりアルカ

リフォスファターゼ標識DNAプローブを作製した。

#### 【0025】2. 方法

##### ①PCRによるHBV DNAの増幅

PCR試薬としてCetus社製Gene Amp™ PCR Kitを用い、PCR増幅を行なった。即ち、HBV DNAを組み込んだプラスミド液1μlに、10倍濃縮Taq緩衝液5μl、25mM dNTP液0.2μl、Taq DNA polymerase 1単位を加え、更にプライマーA及びBを各々12pmol加え、滅菌水で総量50μlとした後、変性：94℃50秒、アニーリング：62℃40秒、伸長：72℃120秒のサイクルを40サイクル行うことによって目的のDNAを増幅した。

##### 【0026】②PCR増幅産物のλ-エキソヌクレアーゼ処理

PCR増幅産物をフェノール処理、エタノール沈殿によって精製し、精製水に溶解した。精製PCR増幅産物液1μlに0.025M MgCl<sub>2</sub>含0.67M Glycine-NaOH(pH9.4) 1μl、λ-エキソヌクレアーゼ(Bethesda research laboratory製) 0.5単位を加え、精製水で総量10μlとし、37℃、10分間反応後、サンドイッチハイブリダイゼーション反応に供した。

【0027】③サンドイッチハイブリダイゼーション法  
DNAプローブ標識固相の1ウェルに測定試料5~10μlを加え、100ng/mlのアルカリフォスファターゼ標識DNAプローブ90~95μlを加え、総量100μlに調整し、37℃、4時間反応させる。反応終了後、ウェルを1%SDS含2X SSC[0.3M NaCl含0.03M Na-citrate(pH7.0)]で3回洗浄し、p-NPP基質液[10mM p-nitrophenyl phosphate in 50mM MgCl<sub>2</sub>含1M diethanolamine buffer(pH9.8)]を加え、37℃、4時間反応させる。反応後1N NaOH 100μlを加え、反応を停止し、405nmでの吸光度を測定した。

#### 【0028】3. 結果

図3に、PCR増幅産物をλ-エキソヌクレアーゼ処理したもの(○)、λ-エキソヌクレアーゼ処理しないもの(□)、λ-エキソヌクレアーゼ処理をせずに加熱急冷変性したもの(●)の3種の試料について上記のサンドイッチハイブリダイゼーション法による測定を行った結果を示した。その結果、λ-エキソヌクレアーゼ処理しないものではまったく反応が認められず、加熱急冷変性したものではわずかに反応が認められるものの、λ-エキソヌクレアーゼ処理したものにおいて最も感度の高い結果が得られた。加熱急冷変性したものではおそらく解離したDNAの再アニーリングによって反応が妨害を受けているのではないかと考えられる。

#### 【0029】

【発明の効果】以上のように、本発明の測定法においては、PCRに用いるプライマー 2種の内の1種は5'末端にリン酸が付加したものが使用されているので、得られるPCR増幅産物をλ-エキソヌクレアーゼ処理することにより、1本鎖DNAが生成する。この1本鎖DNAをサンドイッチハイブリダイゼーションによって測

定するので、再アニーリングの妨害を受けることがなく、感度良く且つ高精度で測定できることができ、しかも測定操作が簡便であるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

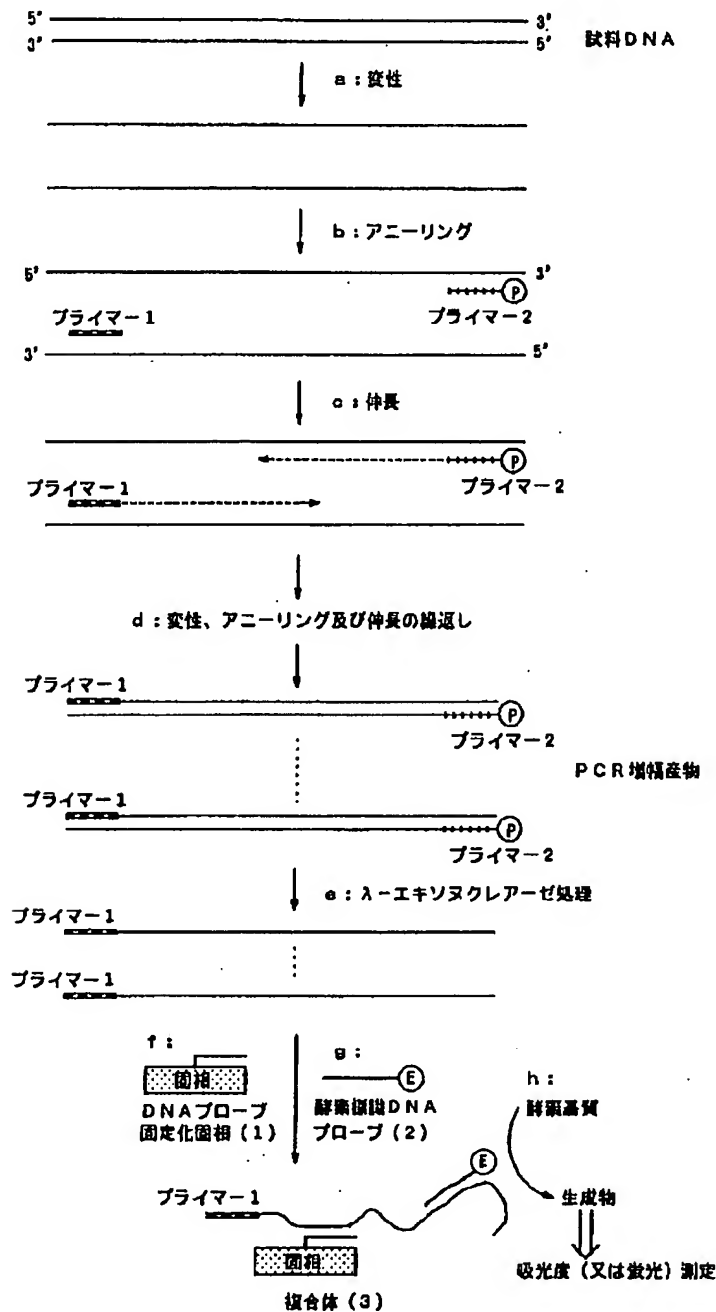
【図1】 本発明の測定法の一例を模式的に示す概略工程図である。

【図2】 本発明の測定法の他の例を模式的に示す概略工

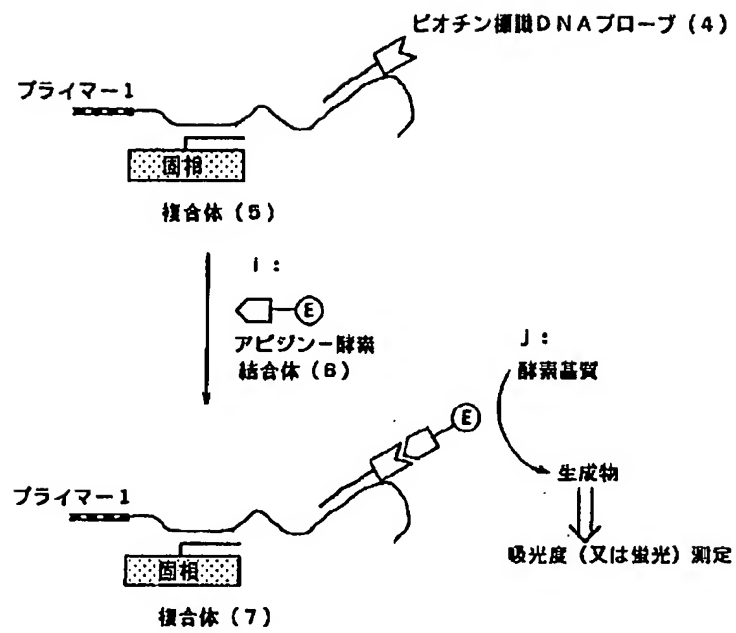
程図である。

【図3】 PCR増幅産物をサンドイッチハイブリダイゼーション法で測定した結果を示す図である。図中、○はλ-エキソヌクレアーゼ処理したもの、□はλ-エキソヌクレアーゼ処理しないもの、●はλ-エキソヌクレアーゼ処理をせずに加熱急冷変性したものを示す。

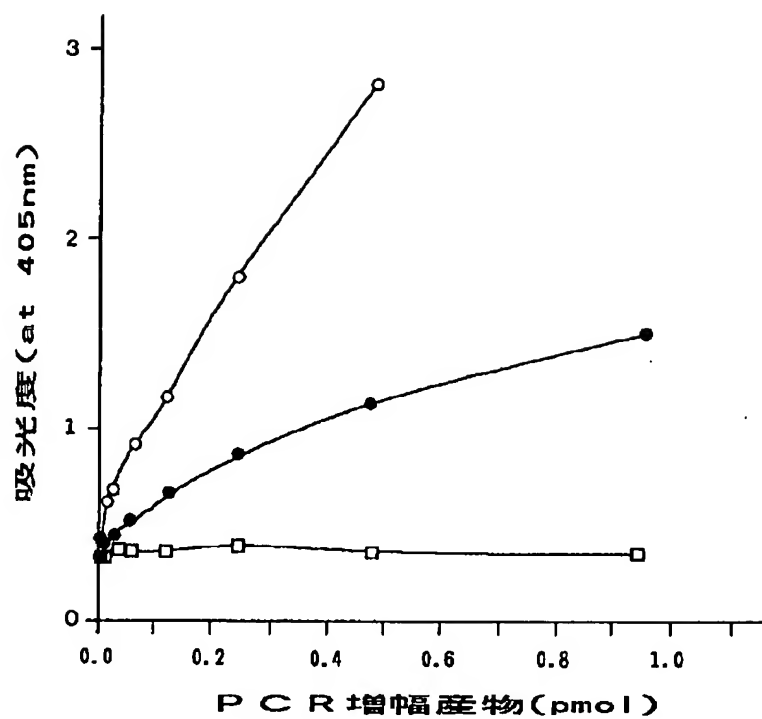
【図1】



【図2】



【図3】



- : λ-エキソヌクレアーゼ処理したもの  
●: 加熱急冷変性したもの  
□: λ-エキソヌクレアーゼ処理しないもの